

USEFUL MICROORGANISM AND METHOD FOR UTILIZATION THEREOF

Patent Number: JP3236771
Publication date: 1991-10-22
Inventor(s): SUEYOSHI TADASHI; others: 02
Applicant(s): MEIJI SEIKA KAISHA LTD
Requested Patent: JP3236771
Application Number: JP19900029544 19900213
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N1/20 ; C09K17/00
EC Classification:
Equivalents: JP2553727B2

Abstract

PURPOSE: To obtain a useful microorganism excellent in oil reducing and deodorizing effects on wastes, excreta, etc., by using *Bacillus subtilis* BN1001 having specific mycological properties as an ingredient.

CONSTITUTION: *Racillus subtilis* BN1001 newly separated from soil has the following bacteriological properties. (A) morphological properties; (1) a nutrient cell cultured in bouillon agar is bacillus of 0.5-0.7X1.5-3.0μ size, (2) positive to Gram staining, (3) forming endospores by culturing at 30 deg.C for 2-3 days, an elliptical shape of 0.5-0.7X0.8-1.5μ, etc., (R) culturing properties; (1) well growing by culturing at 30-45 deg.C for 1-3 days in a normal agar culture medium, (2) well growing in bouillon agar with colonies assuming a brown creamy shape without producing diffusive pigments, etc., (C) physiological properties; (1) positive to reducing properties with nitrates, (2) negative to denitrifying reaction, (3) positive to the Voges-Proskauer (VP) reaction, (4) negative to the methyl red (MR) test, (5) positive to hydrolysis properties of starch, etc.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑪公開特許公報(A)

平3-236771

⑫Int. Cl. 5

C 12 N 1/20
 C 09 K 17/00
 C 12 N 1/20
 //C 12 N 1/20
 C 12 R 1:125

識別記号

府内整理番号

⑬公開 平成3年(1991)10月22日

F 7236-4B
 C 6742-4H
 D 7236-4B

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全7頁)

⑭発明の名称 有用微生物及びその利用方法

⑮特 願 平2-29544

⑯出 願 平2(1990)2月13日

⑰発明者 末吉 忠 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社生物科学研究所内
 ⑱発明者 栗田 利章 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社生物科学研究所内
 ⑲発明者 日高 秀昌 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社生物科学研究所内
 ⑳出願人 明治製菓株式会社 東京都中央区京橋2丁目4番16号

明細書

1. 発明の名称

有用微生物及びその利用方法

2. 特許請求の範囲

(1) 下記の生物学的性質を有するバテルス・サブトリクスBN1001 (*Bacillus subtilis* BN 1001)

(1) かん菌

(2) グラム染色:陽性

(3) 内生胞子を形成、長円形

(4) 運動性あり

(5) 抗酸性染色:陰性

(6) 告通寒天培養:よく生育

(7) 肉汁寒天培養:生芽は良い、集落は茶色
クリーム様

(8) 肉汁液体培養:表面に白色の菌膜を形成

(9) 糖酸塩の発芽性:陽性

(10) VP反応:陽性

(11) スターチの加水分解性:陽性

(12) カタラーゼ:陽性

(13) クエン酸の利用性:陽性

(14) アルギニンの分解性:陰性

(15) インドールの生成:陰性

(16) 硝化水素の生成:陰性

(17) オキシダーゼ:陽性

(18) ウレアーゼ:陰性

(19) リジンデカルボキシラーゼ:陽性

(20) 食肉性:10%食塩添加肉汁寒天培地上
で生育

(21) 生育温度:25~45℃の温度範囲でよく生
育

(22) O/Fテスト:O型

(23) ヒューレイフソン各地による糖の利用性
:D-グルコース、L-アラビノース、D-キ
シロース、D-マンニトール、ソルビトール、
シュークロースからの糖の生成が認められるが、
ガスの発生は認められない

イノシトール、テムノース、メリビオース、
ラフィノースからの糖とガスの生成は認められ
ない

- (2) バチルス・サブチリスBN1001の培養
生菌体及び生菌剤を用いて油脂を分解する方法
- (3) バチルス・サブチリスBN1001の培養
生菌体及び生菌剤を用いて悪臭を除去する方法
- (4) バチルス・サブチリスBN1001の培養
生菌体及び生菌剤を用いて悪臭の発生を抑制する方法
- (5) バチルス・サブチリスBN1001の培養
生菌体及び生菌剤を用いて糞尿浸水の通りを除去する方法
- (6) バチルス・サブチリスBN1001の培養
生菌体及び生菌剤を用いて動物の増体を図る方法
- (7) バチルス・サブチリスBN1001の培養
生菌体及び生菌剤を用いて土壤を改善する方法
- (8) バチルス・サブチリスBN1001の培養
生菌体及び生菌剤を用いて有機肥料を調製す

グ剤等の脱臭剤が市販されている。しかし、ロヘキサン抽出物質の減少、スカムの分解、脱臭、悪臭発生防止に満足できるものは少ない。特に近年の高年齢化に伴い高血圧あるいは糖尿病等を服用する人が増え、従来の薬用具とは異なる臭気がトイレおよびその周辺を支配し、その対策に苦慮している関係者が多い。また養魚場、養豚場、うづら飼育場その他動物の繁殖場も作業者や周辺の住民にとっても苦痛の種である。また近年、鯛養殖等を水槽あるいは池で飼育する人が増えているが、水槽あるいは池から発する臭気および水の交換等に悩む人が多い。また植物を愛好する人も多く、土壤を改善し、きれいな植物を生育したいという要望もある。また、經濟動物を効率的に飼育することができればという要望も多い。

【発明が解決しようとする課題】

家庭あるいは各種事業所から排出される含油排水中のロヘキサン抽出物質を減らしたいという技術分野、廻房の排水槽にたまるスカムを分解しきつこのスカムから発生する悪臭を消臭したいと

る方法

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明はバチルス・サブチリスBN1001(*Bacillus subtilis BN1001*)及び含油排水中のロヘキサン抽出物質を減じる方法、廻房等の排水槽にたまるスカムを分解する方法、排水廃物及びトイレ等からの悪臭を除去する方法、悪臭の発生を抑制する方法、浮水化を図る方法、土壤を改善する方法、有機肥料とする方法、飼料効率の改善を図り、動物の増体を図る方法、に関するものである。

【背景の技術】

環境保全の立場から、家庭あるいは各種事業所から排出される含油排水中のロヘキサン抽出物質の規制強化が叫ばれている。また、家庭あるいは各種事業所から排出される排水廃物、スカム等のとりわけ不快臭を放つものに対しては、脱臭処理が要求されその処理のために、あるいはこれから発生するであろう悪臭の防止に、色々なマスキン

いう技術分野、家庭あるいは各種事業所から排出される排水廃物等から発する不快な臭気を軽減あるいはなくしたいという技術分野、これから悪臭発生が予測されるところの悪臭発生の防止を図りたい技術分野、トイレあるいは厩舎を含めた各種動物の排泄する糞尿からの臭気を軽減あるいはなくしたいという技術分野、また生ゴミや各種動物の排泄する糞尿等を有機肥料として再利用したいという技術分野、鯛養殖を飼育する水槽あるいは池から発する臭気の軽減および浄水技術分野、土壤を改善したいという技術分野、經濟動物の飼育効率向上を求める技術分野で安全性にすぐれかつ改善効果を有し満足できるような培養生菌体及び生菌剤を提供することが本発明の課題である。

【課題を解決するための手段】

本発明者は、含油排水中のロヘキサン抽出物質を減ずる微生物を発見すべく、各地域の土壤より微生物のスクリーニングを実施した結果、バチルス属に属する新しい菌を見出し、これをバチルス・サブチリスBN1001と名した。

このバチルス・サブチリスBN1001の培養生菌体を含油排水で試験するうちに脱油効果の中に脱臭効果を発見し、家庭あるいは各種事業所から排出される排水汚物とりわけ不快臭を発する所からの脱臭効果を認定し確認した。さらにトイレや各種動物の糞尿の臭気も不快を覚えない程に軽減すること、生ゴミ等これから悪臭の発生が予測されるところで悪臭発生が抑制されること、各種動物の糞尿は有機肥料として再利用できること、脱臭兼同育水槽や池での魚貝類および浮遊効果も発見した。さらに土壤に入れよく越せた後、植物の根を覗いたところその生育の良さを発見、また各種経済動物の飼料に添加した結果、飼料利用率の向上、動物の増体が図られることをも発見した。このような新しい知見を得、更に確認し試験した結果、本発明が完成されたのである。

すなわち、本発明はバチルス・サブチリスBN1001の培養生菌体及び生菌剤に関する。

本発明の菌株は、本発明者らが土壤から新たに分離したバチルス・サブチリスBN1001であ

名

(5) スキムミルク培養：アルカリ性を呈し、ペプトン化される

C. 生理的性質

- (1) 制酸塩の還元性：陽性
- (2) 脱芽反応：陰性
- (3) VP反応：陽性
- (4) MRテスト：陰性
- (5) スターチの加水分解性：陽性
- (6) 硝酸塩およびアンモニウム塩を利用する
- (7) 色素の生成：顕著な水溶性および非水溶性色素を生成しない
- (8) カタラーゼ：陽性
- (9) クエン酸の利用性：陽性
- (10) アルギニンの分解性：陰性
- (11) インドールの生成：陰性
- (12) 硫化水素の生成：陰性
- (13) オキシダーゼ：陽性
- (14) ウレアーゼ：陰性
- (15) リジンデカルボキシラーゼ：陽性

り、本菌の細菌学的性状は次の通りである。

A. 形態的性質

- (1) 内汁寒天で培養した栄養細胞は、0.5~0.7×1.5~3.0μmの球菌
- (2) グラム染色は陽性
- (3) 30℃ 2~3日の培養で内生孢子を形成、0.5~0.7×0.8~1.5μmの長円形
- (4) 孢子は胞子のうのはば中央に位置し、胞子のうの膨らみは殆ど認められない
- (5) 周毛により運動
- (6) 抗酸性染色は陰性

B. 培養的性質

- (1) 普通寒天培養：30~45℃、1~3日の培養でよく生育する
- (2) 内汁寒天培養：生育は良好で葉苔は茶色クリーム様を呈し、基部性色素は生成しない
- (3) 内汁破布培養：破布に白色の菌膜を形成する
- (4) 内汁ゼラチン穿刺培養：剛性に液化され

(16) 制食塩性：10%食塩を如肉汁寒天培地上で生育する

(17) 生育温度：25~45℃の高温範囲でよく生育するが、55℃では生育しない

(18) 酸素条件下での生育は認められない

(19) O/Fテスト：O型

(20) ヒューレイフソン培地による糖の利用性：D-グルコース、L-アラビノース、D-キシロース、D-マンニトール、ソルビトール、シューキロースからの糖の生成が認められるが、ガスの発生は認められない

イノシトール、ラムノース、メリピオース、ラフィノースからの糖とガスの生成は認められない

以上の微生物的性質を有するBN1001株をバーギィズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー 1988年版 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1988) に記載された既知菌種と比較し、好気性のグラム陽性かん菌

で内生胞子を作り、カタラーゼ陽性であることから本株はバチルス属に所属すると判定、更に胞子と胞子のうの形態および各種の生理的性質よりバチルス・サブテリスに所属すると同定した。しかし、典型的なバチルス・サブテリスとはnヘキサン抽出物質の低減量化、スカムの分解、脱臭、冷凍化、土壤改善化、肥料効率化、堆肥促進化等にすぐれた有用性を示す点で異なっており、新菌株とした。本菌株は、工業技術院微生物工業技術研究所に微生物登録第11132号 (FERM P-11132)として寄託されている。

【実験例】

以下、本菌の製造例および得られた培養生菌体、生菌剤を使用した試験例を示すが、本発明はこれらに限定されたものではない。

製造例 1

水道水15Lにグルコース75g、肉エキス105g、ペプトン150g、塩化ナトリウム45gを溶解させ、pHを7.2に調整した培地を30Lジャーファーメンターに入れ、121℃30分間殺菌し、冷却後これ

にあらかじめ前培養しておいたバチルス・サブテリスBN1001の培養液を接種し、30℃24時間通気流はん培養した。

このようにして得た培養液をバチルス・サブテリスBN1001の培養生菌体としても利用できる。が、この培養液にパライドを加えて混合し、更にこれを乾燥後粉砕することにより、バチルス・サブテリスBN1001の生菌剤1.3kgが得られる。この生菌剤に含まれる生菌数は 1×10^9 個/gであった。

製造例 2

市販大豆粕1kgにpHを7に調整したコーンスティーブリカー(CSL)500g、水道水300gを加え、よく混合し、121℃60分間殺菌し、予め前培養しておいたバチルス・サブテリスBN1001の培養液を接種し、30℃120時間培養した。このようにして得られた培養物に炭酸カルシウムを混合してバチルス・サブテリスBN1001の生菌剤1.6kgを得た。この生菌剤に含まれる生菌数は 1×10^9 個/gであった。

試験例 1

コーン油1000ppm、酵母エキス0.3%、リン酸二水素アンモニウム0.1%、塩化カリウム0.02%、硫酸マグネシウム0.02%、pH7.8の油酸培地に製造例1で調製したバチルス・サブテリスBN1001の生菌剤を入れ、30℃で22時間振とう反応させ、nヘキサン抽出物質の量を測定した。その結果を第1表に示す。

第1表

	nヘキサン抽出物質
反応開始前	1030 ppm
反応終了後	140 ppm

試験例 2

各種油脂について試験例1に記述した方法で試験し、減少量を試験開始時のnヘキサン抽出物質量で除し、その比率を油酸分解力として第2表に示す。

第2表

	油酸分解力		油酸分解力
オリーブ油	74%	ゴマ油	64%
米ヌカ油	73	大豆油	80
サフラン油	88	なたね油	82
つばき油	73	ヤシ油	72
綿実油	92	バーム油	84

試験例 3

菓子工場の排水(原水)をサンプリングし、製造例1で調製したバチルス・サブテリスBN1001の生菌剤を入れ、30℃で22時間振とう反応させ、nヘキサン抽出物質の量を測定した。その結果を第3表に示す。

第3表

	nヘキサン抽出物質
反応前	160 ppm
反応後	10 ppm

試験例 4

中華レストランの排水処理槽（6トン容量）に製造例1で得た生菌剤を初回に500 ppm、以後2週間毎に500 ppmを、さらに調理場の流しより毎日50 gを投入し、固化したスカムの変化をみた。その結果、2週間後には、表面が黒ずみ、やや軟化の状態を示し、4週間後には、明らかに軟化、上から手で押すと表面が見える程になった。

なお、生菌剤投入前には、スカム周辺から悪臭が発していたが、2週間後には消臭した。3ヶ月後には、スカムの固化した状態はなくなつた。

試験例 5

ファミリーレストランの排水処理槽（12トン容量の合併槽）に製造例1で調製した生菌剤を試験例4と同じ方法で投入した。試験例4と同じくスカムは固化しており上から手でつついで割れず、水をかけても軟化し難い状態を示していた。更に悪臭がひどく、周辺より苦情が多く、レストランの関係者は困っていた。

生菌剤の投入を開始して、排水処理槽のスカムの状態の変化、放流水の透視度および処理槽およ

びその周囲の臭気を観察した。水の透視度は透視計を使用、臭気はポータブル型ニオイセンサーXP-320型（新コスモス電気株式会社製）を使用、スカムの状態は肉眼観察した。なお現場試験に先立ち、不快臭の強い排水を排水処理槽からサンプリングし、これを三角フラスコに入れ、製造例1で得た生菌剤を投入したものとしないものについてヘキサン抽出物質の量及び臭気の測定を実施した。なお生菌剤の投入は試験開始時のみとし、30℃で振とう反応した。フラスコでの試験結果を第4表に、現場試験での結果を第5表に示した。

臭気の測定

ニオイセンサーは排水処理槽の水上から5~10mm離れた不快な臭気を感じないところでの臭気を100に調整して、排水処理槽とその付近の臭気を測定した。この数値が高い程、不快臭の強いことを意味し、単位はない。

130~150の数値レベル：やや臭気を感じる程度
200~250の数値レベル：臭気として誰もが認め

ファミリーレストランやホテル等の食事研究施設で利用できる。

第5表 ファミリーレストランでの現場試験結果

	臭気(単位なし)		nヘキサン抽出物質		スカムの状態	
	生菌剤の投入		生菌剤の投入			
	無し	有り	無し	有り		
試験開始時	340	340	250 ppm	250	微細の塊まり	
1日後	370	285	260	20	表面が黒く、塊目あり	
2週間後	410	205			ソフト化していく	
3週間後	395	110			表面が所々に見える	

臭気の単位は、ない（周辺との比較値である。臭気の測定参照）

試験例 6

うづら場から排出される第1工場に製造例1の生菌剤5gを入れ、1ヶ月後の臭気を試験例1に示した方法で測定した結果、試験開始時450あった臭気が130と減っていた。

また、うづら場東端にて第1トンあたり5gを毎日投入、さらに1週間に250gを投入し、2ヶ月後過渡臭気を測定した結果、試験開始時280あった臭気が130と減り、測定の結果を認め、うづら場及びこれと類似する調理場、厨房 ほかで

る程度
300以上の数値レベル：誰もが不快感を訴える
ほどの臭気

第4表 ファミリーレストランでの悪臭水抜取り試験結果

	臭気(単位なし)		nヘキサン抽出物質		スカムの状態	
	生菌剤の投入		生菌剤の投入			
	無し	有り	無し	有り		
試験開始時	340	340	250 ppm	250	微細の塊まり	
1日後	370	285	260	20	表面が黒く、塊目あり	
2週間後	410	205			ソフト化していく	
3週間後	395	110			表面が所々に見える	

第4表に示す通り、生菌剤を投入した区では、臭気、nヘキサン抽出物質の量が減っている。第5表の現場試験結果もアクスコ試験の結果を裏付けている。即ち、生菌剤を投入することにより、透視度の向上が図られると同時に悪臭が抑制され、かつnヘキサン抽出物質の量も減じることから、

の利用が考えられる。

試験例 7

醸糞魚水槽（50L 容量）に製造例 1 の生菌剤 20 ~ 60mL を毎日投入した結果、投入まもなく魚糞が消失、さらに水槽の水の交換も約 1 ~ 2 週間遅らせることができた。なお、魚が本生菌剤の投入により死ぬということはなかった。即ち、家庭あるいは養魚場での利用が可能である。

試験例 8

家庭から排出される生ゴミに製造例 1 の生菌剤 3 ~ 5g を就寝前に入れた結果、翌朝には猫もが気付かない程に消臭した。同じ現象を不快臭を発している屁し、風呂場、洗濯機置場、トイレでも効果を確認した。また、屁しや風呂場でのスルヌルした状態がなくなり、家庭での屁に悪臭が発生している場所あるいはこれから悪臭が発生すると予想される所での利用が可能である。

試験例 9

製造例 1 の生菌剤 3 ~ 5g を土壌 500g に混合したものとしないものに、飼料の福を跨き、その

成長を比較した結果、生菌剤を入れた方が無菌加区に比べて約 6 ~ 10% 長く生長し、得られた種子の数は約 1 割多かった。

また、臭気の強い土壤に製造例 1 の生菌剤を混ぜあわせた結果、1 ~ 2 日して臭気は消失。この土壤にネギを植え一般土壤と比較した結果、飼料同様、ネギの生長に約 5% 程の差を認め、収穫量の増大が図れる結果を得た。

試験例 10

製造例 2 の生菌剤 50 ppm を市販ブロイラー前期用（くみあい飼料）の飼料に添加したものとしないものを準備し、生後 2 ~ 3 日のブロイラーに給与して成長試験を実施した。結果は第 6 表に示す通りである。

第 6 表

	生菌剤の添加	
	無し	有り
飼育日数	49日	49
試験開始時平均体重	43g	43
試験終了時平均体重	1900g	2067
平均体重	1857g	2024
増体重指数	100	109
平均飼料回収量	4253g	4412
飼料要求率	2.29	2.18

第 6 表に示すように、本発明の生菌剤を添加した配合飼料を給与することにより、大幅な増体重効果がみられるとともに飼料要求率も改善することができた。

〔発明の効果〕

本発明は、新規に分離されたバチルス・サブテリス B N I 0 0 1 に酵するものであり、これを含む排水槽、不快臭を放つ排水物に投入するこ

とに上り、減菌効果、除臭効果および浮遊効果を発し、さらに土壤に混合することにより植物生長促進効果、有機肥料化の改善効果を、さらに動物に投与することにより、増体効果、飼料効率の改善効果といった多機能の広範かつ卓識した効果を有するものである。

また本発明は、酵作用のない安全な排水物処理剤として、あるいは飼料添加剤として環境改善、排水物処理、農業、畜産業、水産業といった各技術分野において重要な役割を果たすものである。

出願人 明治製薬株式会社

手 続 補 正 書 (自記)

平成 2 年 3 月 22 日

特許庁長官 吉田文毅 謹

1. 事件の表示

平成 2 年 特許第 第 29544 号

2. 発明の名称

有用微生物及びその利用方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 〒104 東京都中央区京橋二丁目 4番 16号

名称 竹内製薬株式会社

代表者 井上 勝



4. 補正命令の日付 なし

5. 補正により増加する請求項の数 なし

2. 3.22
五点捺
交付

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細を説明の欄

7. 補正の内容 別紙のとおり

6. 明細書第 17 頁 第 4 表を次のとおり訂正する。

	臭気(単位 なし)		n-ヘキサン抽出物質	
	生菌用の投入		死菌用の投入	
	無し	有り	無し	有り
試験開始時	340	340	250 ppm	250
1 日 後			260	20
1 週間後	370	285		
3 週間後	410	205		
3 週間後	395	110		

1. 明細書第 7 頁上から第 10 行目

「臭気」を「臭異味」に訂正する。

2. 同・第 9 頁上から第 6 行目

「脱臭反応」を「脱臭反応」に訂正する

3. 同・第 14 頁 第 2 表の外側の囲いの線で下記の引き過ぎた部分の線をけずす。



この引き過ぎた部分の線をけずす。

4. 同・同頁第 3 表

「反応前」を「反応開始時」に

「反応後」を「反応終了後」に訂正する。

5. 同・第 16 頁下から 7 行目

「風上」から 5 ~ 10」を「風上、5 ~ 10」に訂正する。